

氏 名	加 田 茂 樹
学位(専攻分野の名称)	博 士 (バイオサイエンス)
学 位 記 番 号	乙 第 890 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 25 年 11 月 20 日
学 位 論 文 題 目	納豆発酵過程の分子生理学的研究
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・農学博士 吉 川 博 文 教 授・農学博士 新 村 洋 一 博士(農学) 吉 田 健 一*

論文内容の要旨

納豆は日本の伝統的な発酵食品の一つであり、蒸煮した大豆に *Bacillus subtilis* に属する納豆菌の胞子を添加し、適温適湿にて発酵させることにより製造される。その製造工程の簡素さとは対照的に、納豆発酵は複雑な生物学的過程から構成されていると考えられる。すなわち①大豆表面上での納豆菌の生育、②プロテアーゼの分泌と大豆蛋白質の分解、③オリゴペプチドやアミノ酸の細胞内への取り込みと代謝、④ D,L-グルタミン酸 (Glu) のラセミ化と合成、⑤納豆の糸の主成分ポリ- γ -グルタミン酸 (γ -PGA) の生産と分泌などである。納豆菌は遺伝的に不安定である上にコンピテンス能が低く遺伝学的操作に適していないこと、更に同種とされる枯草菌 *B. subtilis* Marburg 168 株の分子生物学的扱いが極めて容易であることから、これまで *B. subtilis* としては 168 株を対象とした解析が進展し、納豆菌を対象とした胞子形成や蛋白質分泌などの生物学的事象の解析はおろか、納豆発酵そのものを分子レベルで理解しようとする試みはほとんどなされてこなかった。しかし、168 株では納豆を製造できず、得られた知見をそのまま納豆菌には適用できないため、実際に遺伝学的取扱いに不適な納豆菌を用いて解析を行う必要があった。近年、変異処理により形質転換可能な納豆菌変異株 (r22 株) が取得されて、遺伝学的取扱いが可能になっていたことから、本論文では、r22 株に逆遺伝学的手法を適用し、それに従来からの生化学的手法を組み合わせることで、納豆発酵過程を分子生理学的に明らかにすることを目的とした。第 1 章では、納豆品質を規定する曳糸性を指標に、納豆発酵において重要な役割を果たすプロテアーゼを同定した。第 2 章では、納豆の糸の主成分 γ -PGA に含まれる D-Glu を生成するグルタミン酸ラセマーゼの機能分化に関する解析を行った。第 3 章では、納豆発酵終了後に二次的に発酵して生じるアンモニア (NH_3) の生成経

路について同定を行った。

1. 納豆の曳糸性に重要な役割を果たす菌体外プロテアーゼの同定

納豆発酵では、その発酵過程において菌体外にプロテアーゼを分泌することが知られており、その重要性が報告されている。168 株ゲノムには菌体外プロテアーゼ遺伝子が 8 種 (*aprE*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *npr*, *BnprE*, *vpr*, *wprA*) 存在する。納豆菌にも同様のプロテアーゼ種が存在することが推測されるが、納豆発酵においていずれのプロテアーゼが重要であるかはほとんど解析されていない。そこで、納豆発酵の仕上がりを規定する曳糸性、すなわち γ -PGA の生産性を指標に納豆発酵に必須なプロテアーゼ種を同定することを目的とした。

まず、r22 株ゲノム中のプロテアーゼ種を確認するために、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ、r22 株には *nprB* を除く 7 種のオルソログの存在が確認された。なお、*nprB* 遺伝子座近傍をシーケンスしたところ、*nprB* が欠失していることが明らかとなった。以上から、r22 株には、*nprB* を除く 7 種の菌体外プロテアーゼ遺伝子が存在していることが確認された。次に、これら 7 種のプロテアーゼ遺伝子を各々破壊した株を用いて納豆を試作し、発酵直後のプロテアーゼ活性を測定したところ、*aprE* 破壊株でのみプロテアーゼ活性が著しく低下していることを見出した。また、納豆中の遊離アミノ酸濃度を測定したところ、本破壊株では親株に比べて著しく低下していたことから、納豆発酵における主要なプロテアーゼ活性は *AprE* に由来することが確認された。

次に、各破壊株で試作した納豆の γ -PGA 生産量を測定したところ、プロテアーゼ活性と同様に *aprE* 破壊株でのみ γ -PGA 生産量が著しく低下していた。この γ -PGA

* 神戸大学教授 (農学)

生産性不全の原因を解析するために、Glu を豊富に含む GSP 培地に *aprE* 破壊株を植菌したところ、旺盛な γ -PGA 生産性が確認された。このことから、納豆発酵時に観察された *aprE* 破壊株の γ -PGA 生産性不全は基質となるアミノ酸不足に起因するものであることが示唆された。そこで、ミルで挽いた大豆粉に寒天を加えた大豆粉培地を作製し、親株と *aprE* 破壊株を植菌して γ -PGA 生産性を検討したところ、親株でのみ γ -PGA 生産が確認された。次に、大豆粉培地に 2% の Glu を添加して γ -PGA 生産性を検討したところ、*aprE* 破壊株の γ -PGA 生産性の回復が確認された。以上の結果から、AprE は納豆発酵における γ -PGA 生産に必要な基質となるアミノ酸を供給していると考えられた。

AprE は基質となる蛋白質の Glu 残基ではなく芳香族アミノ酸やヒスチジン残基を認識してエンド型に切断することが示唆されていることから、納豆発酵において生産される γ -PGA の基質の大部分はいったんオリゴペプチドまたは Glu 以外のアミノ酸として供給されと考えられる。AprE によって、最初にある程度切断されたペプチドが更に別のプロテアーゼによって細かく切断されることが重要である可能性も排除できないため、*aprE* を除く 6 種 (*bpr*, *epi*, *mpr*, *nprB*, *nprE*, *vpr*, *wprA*) の菌体外プロテアーゼ遺伝子を破壊した 6 重破壊株のプロテアーゼ活性及び γ -PGA 生産量を測定したところ、*aprE* 破壊株ほど大きな影響は確認されなかった。更に、プロテアーゼ以外のペプチダーゼをコードする ORF を 168 株のゲノム情報を基に検索したところ、19 種のペプチダーゼ遺伝子が見出された。これら ORF の局在性を PSORT 検索システムを用いて推定したところ、YwaD のみが細胞外に分泌されることが予測された。YwaD は 168 株とその変異株を用いた菌体外蛋白質のプロテオーム解析においても菌体外に検出されていることから、r22 株でも菌体外に分泌されと考えられた。そこで、*ywaD* 破壊株を作製して γ -PGA 生産性を検討したが、破壊による影響は確認されなかった。以上の結果から、AprE が納豆発酵における γ -PGA 生産に必要な基質を供給することが示された。これまで納豆発酵に菌体外プロテアーゼが重要であることは示唆されていたが、複数存在するプロテアーゼのうち AprE が納豆発酵における γ -PGA の生産に必須であることが初めて明らかとなった。一方で、*aprE* 以外の 6 種の菌体外プロテアーゼ遺伝子を破壊した 6 重破壊株では軟寒天培地上での運動性 (swarm motility) が低下しており、これらのプロテアーゼは従来から予測されている外界の蛋白質を分解して栄養源を獲得する「一次的な」プロテ

アーゼの機能よりも、例えば大豆表面に広がる時の運動性を司るような新たな機能を持つことが示唆された。菌体外プロテアーゼ種の機能は等価ではなく、これらはそれぞれ大豆表面で効率的に生育するために機能していることが推察された。

2. 納豆菌の 2 種のグルタミン酸ラセマーゼに関する生理学的解析

前章で明らかにしたように AprE によって供給されたオリゴペプチドは細胞内に移入された後、細胞内に存在するペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解されて、更にアミノトランスフェラーゼ等のアミノ酸代謝酵素によって Glu に変換されと考えられる。また、AprE によって生じた芳香族アミノ酸やヒスチジンも同様に Glu に変換されと考えられる。これらの Glu は大豆蛋白質に由来するものであることから、L-体の Glu である。一方、 γ -PGA には、L-Glu に加えて D-Glu が豊富に含まれており、D-アミノ酸代謝経路により D-Glu が合成されていることが示唆される。一般的に D-体の Glu を合成する経路としては、L-Glu を直接 D-Glu にラセミ化する経路か、L-Ala を D-Ala にラセミ化した後、これをアミノ基転移反応により D-Glu を合成する 2 経路が存在する。納豆菌の γ -PGA 生産は L-Ala ではなく L-Glu を添加した場合に強く促進されること、また納豆菌抽出物には高いグルタミン酸ラセマーゼ活性が検出されるという報告があることから、L-Glu がグルタミン酸ラセマーゼによって D-体に変換されて γ -PGA 生産に利用されと考えられる。納豆菌には 2 種のグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子 *glr* と *yrcC* が存在しており、これらの組換え体酵素を用いた生化学的解析から Glr は γ -PGA 生産に、YrcC はペプチドグリカン合成にそれぞれ D-Glu を供給していると考えられてきた。しかし、168 株における *glr* オルソログである *racE* が LB 培地における生育に必須な遺伝子であると報告されたことから、Glr の γ -PGA 生産への基質供給に疑問が持たれた。そこで本章では、2 種のグルタミン酸ラセマーゼのうち、いずれが γ -PGA 生産またはペプチドグリカン合成に関係しているのかを明らかにすることを目的とした。

まず、納豆菌におけるこれら遺伝子の必須性を検討した。r22 株を親株にして、*glr* 及び *yrcC* の破壊株を相同組換えにより取得することを試みたところ、*yrcC* 破壊株が容易に取得できたのに対し、*glr* 破壊株を取得することはできなかった。そこで、あらかじめ *glr* を低コピーベクターである pDG148 上の IPTG 誘導型プロモーター P *spac* の直下に挿入して r22 株に導入した株

を作製し、これを親株にしてゲノム上の *glr* 遺伝子を破壊することを試みた。その結果、今度は容易にゲノム上の *glr* 遺伝子が破壊された株（相補株）を取得することができた。更に、*glr* をプラスミド上に持ち、ゲノム上の *glr* が破壊されていない株と、破壊された相補株について、それぞれ選択圧の無い条件下で繰り返し培養したところ、ゲノム上の *glr* が破壊されていない株ではプラスミドが容易に脱落したのに対し、ゲノム上の *glr* が破壊された相補株では選択圧が無いにも関わらずプラスミドが全く脱落しないことが確認された。以上の結果から、168 株と同様に *glr* が必須遺伝子であるのに対し、*yrcC* は非必須遺伝子であることが判明した。従って、Glr はこれまでの予想とは異なり、納豆菌においてもペプチドグリカンに含まれる D-Glu を供給する機能を持つことが示唆された。

次に、*glr* が γ -PGA 生産に必要な D-Glu を供給していることを確認するために、IPTG を添加しないことにより *glr* の発現量を減少させたノックダウン株を作製することを試みたが、IPTG を添加していない場合でも添加した場合と生育速度が変わらず、ノックダウン株を作製することはできなかった。そこで、もう一方の YrpC が γ -PGA 生産に関係していないことを確認するために、*yrcC* 破壊株における γ -PGA の生産量と D/L 比を測定した。その結果、*yrcC* 破壊株は親株と同等の γ -PGA 生産量を示し、また D/L 比にも影響を及ぼさなかった。YrpC が γ -PGA 生産に必要な D-Glu を供給しないことが確認されたことから、もう一方の Glr が γ -PGA 生産に必要な D-Glu を供給することが示唆された。

更に、 γ -PGA 生産培地における *glr* 及び *yrcC* の転写量をノザン解析及び β -ガラクトシダーゼアッセイにより検討した。*glr* の転写は、生育時期を問わず *yrcC* に比べて強く検出され、また、 γ -PGA が生産される定常期においても高い転写量が維持されていたことから、転写量及びそのパターンも、Glr が γ -PGA 生産に必要な D-Glu を供給していることを支持していると考えられた。

また、Glr と YrpC を含むグルタミン酸ラセマーゼオルソログ群のアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成したところ、Glr が D-体の Glu を含む γ -PGA を生産する *B.anthraxis* や近縁な *Bacillus* 属細菌のオルソログと近傍のクレードに位置付けられたのに対し、YrpC は系統的に大きく離れたグラム陰性細菌が多く含まれる別系統のクレードに位置付けられた。Glr は系統樹中でグラム陽性細菌のみが含まれるクレードに位置付けられたことから、納豆菌の祖先に当たるグラム陽性細菌は Glr 型

のグルタミン酸ラセマーゼを保持しており、YrpC はおそらく水平伝播により生じた可能性が示唆された。以上の結果から、これまで納豆菌において 2 種の Glu ラセマーゼは機能分化をしていると考えられてきたが、今回の解析から主要なグルタミン酸ラセマーゼは Glr であり、そのみで γ -PGA 生産にもペプチドグリカン合成にも必要な D-Glu を供給できることを明らかにした。

3. 納豆発酵におけるアンモニア生成の主要経路の同定

第 3 章では、納豆発酵において生成するアンモニア (NH_3) 生成経路について解析を行った。第 1 章及び 2 章で明らかにしてきたように、大豆蛋白質が Apr E によって分解されてペプチドやアミノ酸が生成し、それらが細胞内で Glu へと代謝された後、その一部はグルタミン酸ラセマーゼ Glr によって D-体へと変換される。これら L-または D-Glu が γ -PGA 合成の基質となり、高分子量の γ -PGA が合成されることで納豆の糸が生成し、納豆の「主発酵」は完了する。この後、納豆は低温での熟成期間を経て製品となる。納豆は熟成後も低温流通されているが、適切な温度で管理されないと二次的に発酵して NH_3 を生成する場合がある。 NH_3 臭はいわゆる納豆の香りとは異なり品質劣化を意味するため、これを低減することは産業的にも重要な品質管理項目となっている。そこで、本章では納豆の二次発酵時に生成する NH_3 の生成経路を同定することを目的とした。

納豆発酵における主要なプロテアーゼ活性の本体である *aprE* の破壊株において、二次発酵時に生成する NH_3 が減少することが確認されたため、 NH_3 は大豆蛋白質の分解によって生じるアミノ酸に由来することが示唆された。そこで、二次発酵時の納豆中の遊離アミノ酸の消長を検討したところ、ほとんどのアミノ酸が二次発酵の進展に伴って増加していくのに対し、Glu のみが減少していくことが判明した。そこで、Glu から NH_3 を生成させる Glu 脱水素酵素 (GlutDH) に着目した。168 株ゲノムには 2 種の異化型 GlutDH 遺伝子が存在するが、これらのうち *rocG* が主要な GlutDH をコードしており、他方 *gudB* の遺伝子産物は GlutDH として活性を持たないことが報告されている。一方で、*gudB* の復帰突然変異 (*gudB1*) も報告されており、*gudB* に存在する 3 アミノ酸 (Val-Lys-Ala) の 2 回繰り返しが 1 回になることで活性が復帰する。r22 株におけるこれらの遺伝子配列をシーケンスしたところ、*rocG* のアミノ酸配列は 168 株と同様に活性型であったが、*gudB* の配列もちょうど *gudB1* 変異と相同な配列となっており、r22 株では 2 種の GlutDH 遺伝子はいずれも活性型の酵

素をコードしていると考えられた。そこで、*rocG* 破壊株、*gudB* 破壊株及び *rocG gudB* 二重破壊株を作製して二次発酵時の NH_3 を測定したところ、各単独破壊株では大きな影響は確認されなかったが、*rocG gudB* 二重破壊株では親株に比べて NH_3 生成が約 1/2 に減少することを見出した。以上の結果から、納豆の二次発酵における NH_3 は 2 種の GlutDH によって Glu からの脱アミノ作用によって生じていることが示唆された。

残りの NH_3 生成経路について同定するために、Glu に変換されやすい Glu 族アミノ酸に着目した。大豆中には Glu 族アミノ酸としてアルギニンが比較的豊富に含まれているため、アルギニンからの NH_3 生成が疑われた。アルギニンはまず、アルギナーゼによってオルニチンと尿素に分解され、オルニチンは Glu に、尿素はウレアーゼによって NH_3 と二酸化炭素に分解される。二次発酵過程においてウレアーゼが機能していることを確認するために、ウレアーゼをコードする *ureC* の破壊株を作製して二次発酵時における納豆中の尿素濃度を測定したところ、親株に比べて尿素が蓄積していることが確認された。このことから、二次発酵中にウレアーゼが機能しており、尿素から NH_3 が生成していることが示唆された。そこで、*ureC* 破壊を *rocG gudB* 二重破壊に組み合わせた *rocGgudBureC* 三重破壊株を作製して NH_3 を測定したところ、親株に比べて約 1/5 に減少することを見出した。以上の結果から、納豆の二次発酵で生じる NH_3 は、主に Glu の脱アミノと尿素の分解に由来することが初めて示された。

まとめ

本論文では、納豆発酵において納豆菌が栄養源を獲得し、必要な代謝産物を生成し、そしてその過程で生じる副生成物生成における各現象を解析することで、納豆発

酵を分子生理学的に捉えることを試みた。

納豆発酵におけるプロテアーゼの重要性については、従来より報告がなされているが、いずれのプロテアーゼ種が重要であるかについては解析されていなかった。本論文では AprE が大豆表面上での生育に必要な栄養源獲得に強く関与し、納豆発酵における糸引きに必須であることを明確に示すことができただけでなく、それ以外の複数種存在するプロテアーゼは栄養源獲得よりも、運動性の調整のような新規の機能を持ち、納豆菌の分泌するプロテアーゼ種が等価ではないことを、納豆発酵を解析することで明らかにすることができた。これらのプロテアーゼが納豆表面を広がる際に果たす役割については、今後解析が必要であると考えている。

納豆菌に存在する 2 種の Glu ラセマーゼについてはいずれも D-Glu を供給する役割を持つが、生化学的な特性から γ -PGA 生産に関与する Glr とペプチドグリカン合成に関与する YrpC に機能分化しているとされてきた。しかし、納豆菌におけるこれらを解析した結果、YrpC よりも Glr がペプチドグリカン合成に必要な D-Glu を供給する特性を持つことを初めて明らかにできた。また、納豆菌において *yrpC* 破壊株を初めて取得することで、Glr が γ -PGA 合成に関与することを *in vivo* で示すことに成功した。

納豆における品質上の問題となる副生成物 NH_3 生成についても解析を行った。納豆発酵において通常 NH_3 は発生しないが、低温流通の管理が甘くなると生成して、納豆の品質を著しく損なう。これまで、納豆発酵における NH_3 生成の経路については詳細な解析がなされてこなかったが、主要な NH_3 生成経路を初めて明らかにしたことで、 NH_3 生成しにくい高品質の納豆を製造できる方法へ道を開くことができ、産業上有用な菌を育種することを可能にした。

審査報告概要

平成 25 年 10 月 8 日（火）午後 3 時 30 分から、本専攻が 11 号館 2 階バイオサイエンス専攻大講義室にて開催した学位請求論文の公開本人口頭発表会で、学位請求者 加田 茂樹氏は、40 分間の口頭発表を行い、その後 20 分間の質疑応答を受けた。発表会終了後、主査、副査と専攻委員による審査会議を開催し、提出論文の内容と本人発表ならびに質疑応答について慎重に審査した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしており、質疑に対する応答が適切だと

判断された。また、公表論文に関与した共同研究者との間で学位取得に関して問題が無いことを確認した。さらに、学位記請求論文を中心として、一カ国以上の外国語を含む最終試験に合格していること、当該学位請求論文の内容が学位授与に相当することを全員一致で評決した。

よって、審査員一同は博士（バイオサイエンス）の学位を授与する価値があると判断した。